

La méthode d'immunofluorescence et l'identification des mycoplasmes

Application au diagnostic de la péripneumonie *

par P. PERREAU, P. GAYT et J. MONNIER

Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 94-Maisons-Alfort

RÉSUMÉ

L'application de la méthode d'immunofluorescence à l'identification des mycoplasmes et en particulier à la recherche de *M. mycoides*, dans les cultures comme dans les exsudats pathologiques et les lésions, est effectuée par les procédés classiques en utilisant soit des sérums expérimentaux anti-*mycoides*, soit des sérums de bovins malades naturels. Les résultats montrent que ce procédé est spécifique et que des réactions croisées ne sont pas à craindre avec les autres espèces de mycoplasmes rencontrées chez les ruminants si l'on s'entoure d'un minimum de précautions. Les conditions techniques de ces examens font l'objet d'une description détaillée.

L'emploi de la méthode d'immunofluorescence pour la recherche et l'identification des Mycoplasmes n'est pas nouveau.

En effet, c'est ce procédé qui permit en 1957 de voir pour la première fois (4) *Mycoplasma pneumoniae*, l'agent de la pneumonie atypique dans des coupes de poumon d'embryon infecté de poulet.

En 1962, H. W. CLARK et al. (2) l'utilisent pour déterminer la spécificité antigénique des souches de *M. hominis* 1 et *M. hominis* 2.

Puis la méthode fut appliquée surtout à la recherche des mycoplasmes contaminant les cultures de cellules, domaine où elle se révéla très efficace (6, 1).

En pathologie animale, elle semble avoir le même succès et déjà des résultats sont acquis ;

c'est ainsi que J. K. NOËL, H. M. DE VOLT et J. E. FABER en 1964 l'appliquent à la recherche de *M. gallisepticum* pour en faire une méthode de diagnostic de la mycoplasmosse aviaire (9).

F. R. ROBINSON, R. W. MOORE et H. E. REDMOND (11) en 1967 l'utilisent pour mettre en évidence les colonies de mycoplasmes dans les tissus de porcs infectés expérimentalement par *M. hyoarthrinosa*, agent de synovites et d'arthrites infectieuses, comme dans des cultures de cellules infectées par cette même espèce. La fluorescence semble très spécifique, mais la comparaison n'est faite qu'avec une seule autre espèce, *M. gallisepticum* (souche S6 d'Adler).

E. KARBE et C. F. HELMBOLT en 1968 (3) montrent l'intérêt de l'immunofluorescence dans le dépistage des mammites de la vache provoquées par des mycoplasmes. Grâce à un immun sérum préparé sur lapin avec une souche de *M. agalactiae* var. *bovis* (souche Donetta), les mycoplasmes sont décelés dans le lait avant ou

(*) Ce travail a fait l'objet d'une communication à la XXXVII^e session générale du Comité de l'Office Internationale des Epizooties (Paris, 19-24 mai 1969).

dès l'apparition de l'altération visible de celui-ci. Ici encore la spécificité semble bonne puisqu'on n'observe aucune fluorescence sur 40 échantillons de lait provenant de quartiers atteints de mammites d'origines diverses sans relation avec des infections à mycoplasmes ; en outre, sur de simples frottis effectués avec 29 souches de mycoplasmes appartenant à d'autres espèces (*M. laidlawii*, *M. gallisepticum*, mycoplasmes des pneumonies des petits ruminants, du tractus génital des bovins), on n'observe toujours aucune fluorescence.

Récemment W. N. MASIGA et S. S. STONE (7, 8) appliquent la méthode à la recherche des anticorps et des antigènes de *M. mycoides*, expérimentant ainsi un procédé de plus pour le diagnostic de la péripneumonie contagieuse des bovins. C'est une méthode directe utilisant les anticorps d'un bovin atteint de la maladie naturelle ; la spécificité est satisfaisante puisqu'il ne semble pas exister de réaction sérologique de groupe commune à *M. mycoides*, *M. bovirhinis*, *M. mycoides* var. *capri* et *M. agalactiae*. On peut utiliser non seulement des frottis de culture de *M. mycoides*, mais aussi des frottis préparés directement avec du mucus nasal d'animaux malades ou suspects et des coupes histologiques. Particulièrement intéressante semble être la méthode d'inhibition de l'immunofluorescence, puisqu'elle permettrait selon ces auteurs de déceler des anticorps spécifiques avant que la fixation du complément soit devenue positive.

Il nous apparaît utile d'apporter ici notre contribution à l'étude de cette méthode immunologique d'identification des mycoplasmes en rapportant brièvement les résultats de nos travaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — Les antigènes.

Nous avons employé d'une part des cultures de mycoplasmes, sur milieux solide et liquide, d'autre part du matériel pathologique : liquide pleural de bovins péripneumoniques, liquide d'œdème sous-cutané, fragments de lésions pulmonaires fixés et coupés selon les normes de l'histologie courante.

1) *Souches de Mycoplasmes* : elles appartiennent à notre collection et sont conservées à — 25 °C après lyophilisation :

- *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* : d'une part, des souches virulentes Fatick (Sénégal) et Afadé (Tchad), isolées chez des zébus atteints de péripneumonie ; d'autre part, des souches isolées chez les chèvres et sérologiquement rattachées à la variété *mycoides*, dénommées C11 et VOM.

- *Mycoplasma mycoides* var. *capri* : souches OSB42, Farcha et PG₃ (Freundt).

- *Mycoplasma bovirhinis* : souches PG43 (Freundt), Nantes 1, 4 et 6, Somme 611, 777 et 782, MV5, MV8 et MVX.

- *Mycoplasma bovigenitalium* : souches PG11 (Freundt) et 106/12.

- *Mycoplasma agalactiae* : PG2 (Freundt), AG1 (Bucarest).

- *Mycoplasma laidlawii* : souche L8 (Elford) et S35 (Tchad).

- *Mycoplasma gallisepticum* : souche S6 (Adler) et PG31 (Freundt).

2) Cultures :

Pour l'ensemble de ces souches, le milieu suivant, stérilisé par filtration sur disque Seitz EKS II, fut utilisé :

Bacto P. P. L. O. Broth (sec)...	21 g
Bacto-Tryptose	10 g
Bacto Yeast Extract.....	6 g pH 7,7
Glucose	1 g
Eau	1.000 ml

sans inhibiteurs bactériens et avec du sérum stérile de cheval au taux de 10 p. 100.

Les cultures en milieu liquide étaient examinées sous formes d'étalements fixés à l'alcool méthylique (3 mn) et sans dilution préalable ; une coloration au May-Grünwald Giemsa permettait de juger de la richesse en germes sur des lames témoins.

Quant aux cultures sur gélose (faites avec le milieu précité additionné de 18 g/l de Bacto-Agar), elles furent employées de la façon suivante : lorsqu'au bout de plusieurs jours la culture avait atteint un développement satisfaisant, des carrés de gélose porteurs de colonies étaient découpés, puis renversés et appliqués sur des lames. Pour fixer les « empreintes » de ces colonies, on se servit indifféremment de deux

méthodes bien connues des microbiologistes :

a) le traitement aux vapeurs d'acide osmique durant quelques secondes suivi d'une fixation de 3 mn à l'alcool méthylique ;

b) l'immersion des lames avec leurs blocs dans du liquide de BOUIN. Après opacification totale (5 à 10 mn) et décollement de ceux-ci, les lames étaient lavées plusieurs minutes à l'eau courante.

Dans tous les cas, un rinçage soigneux au tampon merthiolaté précédait l'application du conjugué.

3) Les liquides d'œdème sous-cutané avaient été obtenus par inoculation artificielle sous la peau de bovins de cultures de *M. mycoides*. Ces liquides récoltés aseptiquement étaient conservés lyophilisés et à -25°C avant leur utilisation. Ils furent employés sous forme de frottis fixés à l'alcool méthylique.

4) Les échantillons d'exsudat pleural* avaient été récoltés par ponction thoracique ou prélèvement aseptique immédiat à l'autopsie, sur des bovins péripneumoniques ; ils furent conservés à l'état congelé ou lyophilisé et utilisés comme les liquides d'œdème.

5) Les fragments de lésions pulmonaires* avaient été prélevés sur des bovins malades naturels ou infectés artificiels et avaient initialement servi à l'étude histologique de l'infection péripneumonique (il est important de disposer de fragments découpés dans des lésions débutantes ou au stade de l'hépatisation rouge, comme nous le verrons plus loin). Après fixation au Bouin, les blocs étaient coupés et collés sans précaution particulière ; les coupes recevaient le conjugué fluorescent après immersion prolongée dans l'alcool lithiné et plusieurs lavages au P. B. S. merthiolaté.

Comparativement aux lésions de péripneumonie, furent examinées par les mêmes procédés un certain nombre de coupes préparées à partir de poumons de bovins atteints de pneumonies ou bronchopneumonies infectieuses telles qu'on a l'habitude de les observer durant l'hiver dans les régions tempérées.

Rappelons que ces accidents infectieux sont réunis très communément sous le vocable de grippe bovine, encore qu'il ne s'agisse bien souvent que de complications bactériennes consécutives à l'« agression » des épithéliums du tractus respiratoire par le myxovirus parainfluenza III, et qu'il n'est pas si facile dans certains cas de faire le diagnostic différentiel à l'autopsie entre ces lésions dites de pasteurellose et des lésions localisées de péripneumonie subaiguë.

Précisons qu'au départ, de ces poumons hépatisés nous avons isolé, le plus souvent associées, *Pasteurella multocida* A, *P. hemolytica*, *Escherichia coli* et *Mycoplasma bovirhinis* (cette dernière espèce en quantité souvent abondante dans les lésions d'hépatisation rouge).

B. — Les immuns sérums et les conjugués fluorescents.

Ces essais ont mis en œuvre :

1) des immuns sérums anti-mycoplasmes préparés sur mouton ou sur lapin ;

D'une façon très générale, le protocole d'immunisation des animaux était le suivant :

— une injection initiale sous-cutanée d'un mélange à parties égales d'adjuvant de Freundt (Bacto-Adjuvant Difco) et de suspension de mycoplasmes lavés en P. B. S. merthiolaté (opacité du tube n° 10 ou 20 de BROWN), sous le volume de 5 ml chez le mouton et de 2 ml chez le lapin ;

— après un délai de 4 semaines, une série d'injections intraveineuses de la même suspension de mycoplasmes ajustée au tube n° 2,5 de BROWN, au rythme de deux injections par semaine (2 ml chez le mouton et 1 ml chez le lapin). Le nombre d'injections nécessaires est au minimum de 5 ; en cas d'insuffisance du titre d'anticorps au bout de 7 à 8 injections, celles-ci étaient interrompues et, après un nouveau délai de 1 à 2 mois, une nouvelle série d'intraveineuses identiques était recommencée, avec un résultat satisfaisant le plus souvent.

A titre indicatif, les immuns sérums anti-*M. mycoides* qui nous ont servi avaient pour titres moyens :

- Agglutination lente en tube : 1/320 à 1/640.
- Hémagglutination passive : 1/5120 à 1/20.480.

(*) Nous tenons ici à remercier tout particulièrement notre confrère M. DOUTRE, du Laboratoire National de Recherches Vétérinaires du Sénégal, qui nous a fourni une part importante de notre matériel d'étude.

● Fixation du complément (type Kolmer) : 1/640.

Tous ces sérums étaient fortement précipitants, à l'égard des antigènes polysidiques en particulier. D'abord employés simplement dilués au 1/50 ou au 1/100, dans la méthode indirecte d'immunofluorescence, ils furent ensuite conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine pour servir en méthode directe.

2) des sérums de bovins africains infectés naturellement de péripneumonie et choisis pour leur titre élevé d'anticorps :

● Agglutination rapide sur lame : ++++.

● Hémagglutination passive : 1/2560 à 1/10240.

● Fixation du complément (CAMPBELL et TURNER) : 1/640 à 1/2560.

Ils servirent aussi en méthode indirecte, puis directe (donc après marquage par le fluorochrome).

3) des sérums fluorescents anti-globulines de bovin, de mouton et de lapin commercialisés par l'Institut Pasteur à Paris ;

4) des sérums fluorescents identiques préparés dans notre laboratoire ;

Pour l'ensemble des sérums conjugués par nos soins, le protocole de conjugaison fut très classique :

— précipitation des globulines par le $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à demi-saturation et à froid (4 à 8 °C),

— dialyse de 48 h en solution physiologique tampon (P. B. S. de Dulbecco additionné de merthiolate de Na à 1/5000),

— marquage à l'isothiocyanate de fluorescéine (BD. Mérieux) selon les normes préconisées à l'Institut Pasteur à Paris : poids de fluorochrome égal au 1/40 du poids des globulines, celles-ci étant en solution à 2 p. 100 et le pH ajusté à 9,25,

— passage du conjugué brut sur colonne de Sephadex G. 50 (souvent deux fois),

— conservation des conjugués soit à l'état congelé (— 25 °C) soit à 4° après addition d'un volume égal de glycérine neutre.

Les frottis sur lame et les coupes histologiques furent recouverts de conjugué fluorescent à la

dilution appropriée durant 30 ou 45 mn, à 37° et en chambre humide. Dans la méthode indirecte et dans les réactions d'inhibition, les temps d'application des sérums non marqués étaient identiques. Après rinçage au P. B. S., les préparations étaient montées sous lamelle en tampon glyciné à 33 p. 100 et à pH 7,6.

C. — Matériel optique.

Nous nous sommes servis de matériel Zeiss : statif G. F. L., avec équipement de fluorescence II, lampe à vapeur de mercure OSRAM HBO 200 W/4, filtres d'excitation BG3 et BG12, filtre oculaire d'arrêt 50.

Les objectifs les plus utiles furent les Neofluar 16/0,40 et 40/0,75.

Toutes les observations ont été faites en fond noir, indispensable à notre avis pour les si petits germes que sont les Mycoplasmes et pour avoir un bien meilleur contraste.

RÉSULTATS

A. — Considérations techniques générales.

1) Le meilleur matériel pour l'identification d'une souche semble être la culture en bouillon, étalée sur une lame, pure ou diluée. Si la culture originelle est riche, il peut être utile de la diluer en tampon physiologique au 1/5 ou au 1/10 ; l'examen en sera facilité car les mycoplasmes se détacheront sur un fond beaucoup plus sombre. En effet le milieu est très riche en sérum que la fixation coagule ; d'où la présence sur la lame, après l'application du conjugué, d'une nappe de fond plus ou moins verdâtre enlevant beaucoup de brillant à la lumière de fluorescence spécifique.

Les souches en phase filamenteuse facilitent considérablement l'examen car les formes en chaînettes sont immédiatement identifiables (cf. photo n° 1).

Il est du plus grand intérêt d'avoir des préparations très minces pour que les anticorps puissent « s'accrocher » facilement aux antigènes et il est donc commode d'effectuer les étalements de culture avec le bord d'une lamelle, comme si l'on procédait à un étalement de sang.



Photo n° 1. — Etalement d'une culture de *M. mycoïdes* (souche Fatick virulente) traitée en méthode directe ; les formes filamenteuses particulièrement nettes facilitent beaucoup l'examen.

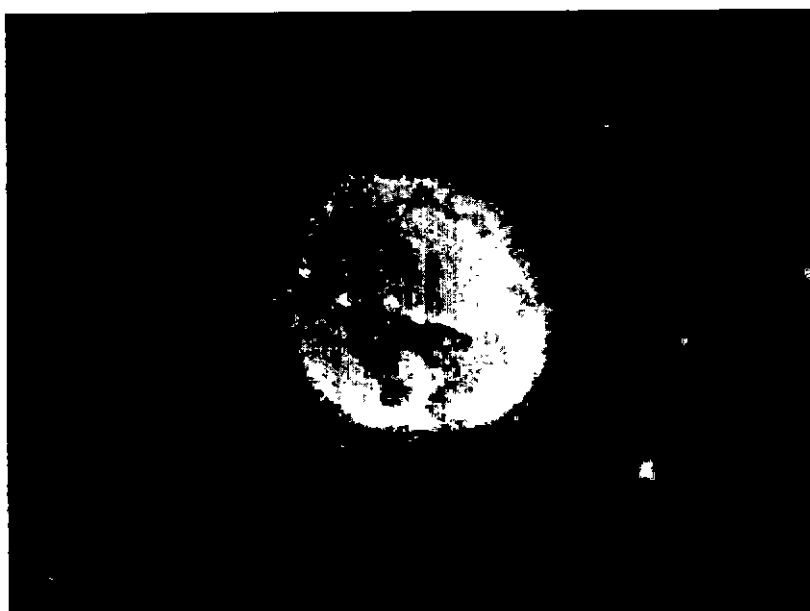


Photo n° 2. — « Empreinte » d'une jeune colonie de *M. mycoïdes* traitée en méthode directe (après fixation au liquide de Bouin) ; c'est la périphérie de la colonie qu'il est très intéressant d'examiner.

2) Les « empreintes » de colonies, effectuées dans les conditions précitées, doivent être examinées à leur périphérie ; en effet la zone centrale de chaque colonie est épaisse, elle représente une grosse masse d'antigène et fixe beaucoup de conjugué. Trop lumineuse et rendue floue par la diffusion importante de lumière, elle ne permet pas d'observation sérieuse. Mais à sa périphérie, des mycoplasmes ont été libérés lors de l'impression du carré de gélose ; ils apparaissent très nets sur fond sombre et la coloration par les anticorps conjugués est suffisamment fine pour révéler le très grand pléomorphisme des mycoplasmes (cf. photos n° 2, 3 et 4).

Le diagnostic différentiel s'effectue avec des « empreintes » aussi bien qu'avec les frottis de culture.

3) Dans la lymphe thoracique des bovins malades ou dans le liquide d'œdème sous-cutané, *M. mycoides* est très visible en immunofluorescence. Malheureusement l'examen des lames est rendu difficile et quelquefois douteux par la présence, de nombreux débris tissulaires (cellules dégénérées, noyaux, fragments de fibrine, éléments impossibles à identifier, nappes

d'exsudat protéique fixé, etc...) qui donnent lieu à des phénomènes de fluorescence non spécifique. Nous croyons aussi que la lecture des étalements serait facilitée si ceux-ci étaient préparés et fixés immédiatement après le prélèvement, la déformation des mycoplasmes étant alors réduite à son minimum.

4) Les coupes histologiques de lésions pulmonaires exigent un mode d'examen un peu particulier. En effet elles fixent beaucoup de conjugué de façon non spécifique et les noyaux des cellules d'infiltration (neutrophiles et macrophages) ont une fluorescence propre qui peut être gênante. L'ensemble de la préparation apparaît donc assez lumineux avec une dominante jaune ou même jaune orangé.

Les mycoplasmes seront localisés et identifiés facilement surtout dans les fentes lymphatiques péri-vasculaires et, plus souvent encore, dans les espaces lymphatiques périlobulaires distendus que l'œil suivra patiemment et dans lesquels ils apparaîtront très brillants, dispersés sur un réticulum acellulaire, verdâtre et plus ou moins déchiqueté, qui n'est autre qu'une section de thrombus lymphatique (cf. photo n° 5).

Ils y sont très abondants au sein des lésions

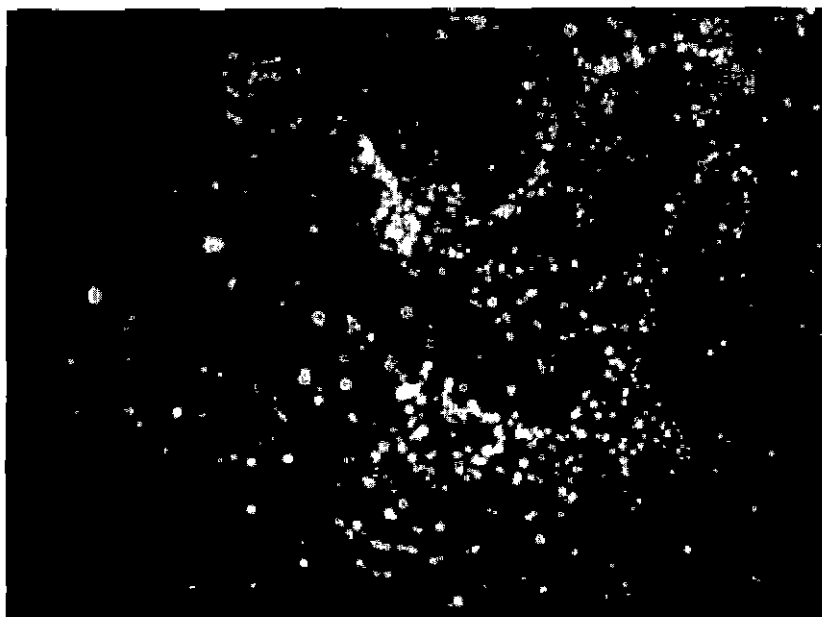


Photo n° 3. — « Empreinte » de colonies de *M. mycoides* fixées au liquide de Bouin ; le pléomorphisme de *M. mycoides* est ici bien visible, les anticorps fluorescents sont fixés sur la surface des formes vésiculeuses.

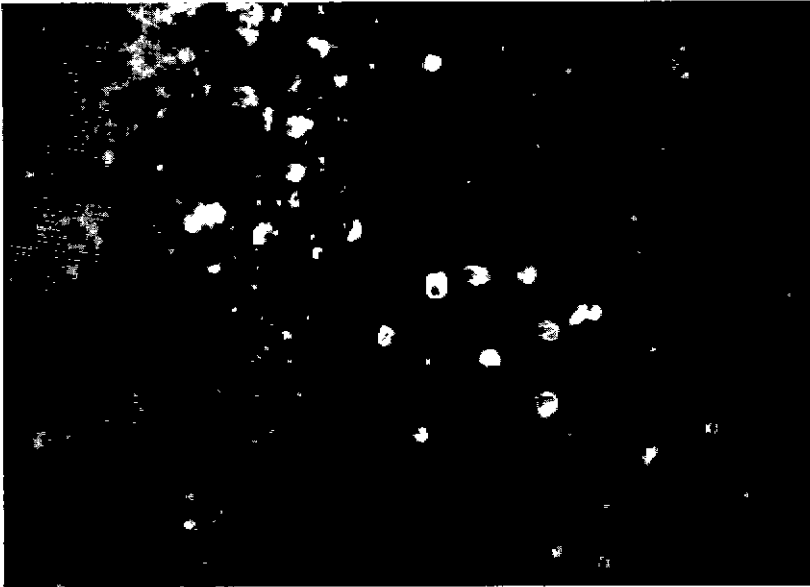


Photo n° 4. — Même préparation ; on voit le bord d'une grosse colonie, d'où s'échappent des formes vésiculeuses.

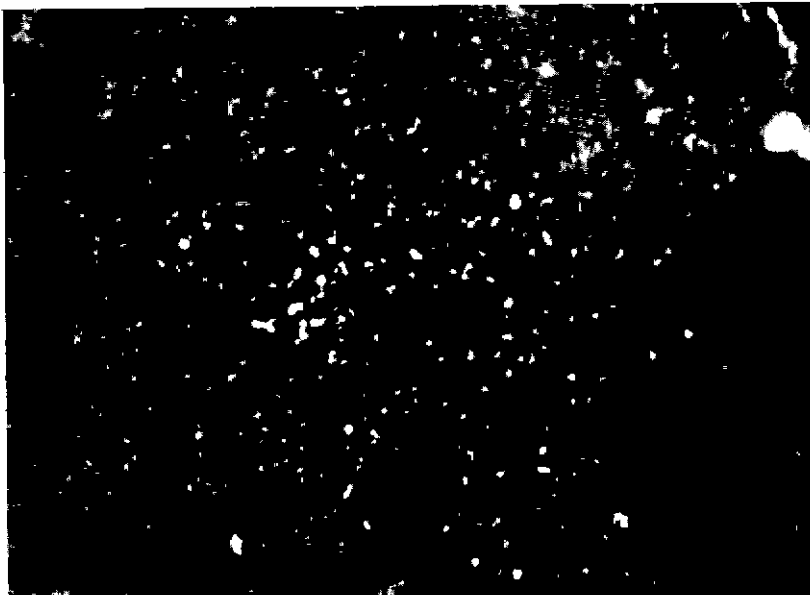


Photo n° 5. — Coupe histologique de poumon infecté par *M. mycoides*, traitée par la méthode directe : on voit ici le contenu d'un vaisseau lymphatique périlobulaire. Sur la lymphe que le fixateur et la déshydratation ont transformé en fin reticulum, se détachent les mycoplasmes très brillants et fort nombreux. La lymphe est une véritable culture dans les lésions débutantes ou aiguës de péripneumonie.

débutantes ou aiguës et se raréfient à mesure que l'inflammation devient subaiguë ou chronique.

Il est fréquent d'observer des images de phagocytose dans les nappées de cellules d'infiltration qui ceinturent et même envahissent ces lymphatiques dilatés ; certains leucocytes semblent contenir de très grosses masses d'antigène spécifique et on est porté à croire que les mycoplasmes phagocytés peuvent continuer à se multiplier, formant ainsi des colonies denses intracytoplasmiques (cf. photos n° 6 et 7).

Dans les alvéoles, les mycoplasmes sont plus difficiles à apercevoir, soit qu'ils y soient rares ou disparus (ce qui semble bien être le cas des lésions au stade de l'hépatisation déjà ancienne), soit qu'ils soient « protégés » des anticorps fluorescents par l'exsudat, les cellules inflammatoires et la fibrine qui combient les alvéoles.

Néanmoins, il n'est pas rare de trouver dans des lésions actives de péripneumonie, au stade de l'hépatisation rouge, des images identiques à celle que montre la photo n° 8 et qui est à nos yeux parfaitement démonstrative.

5) Le critère de spécificité qui fut couramment utilisé avec des résultats réguliers fut celui de l'examen comparatif d'une préparation identique

traitée par un conjugué absorbé par l'antigène homologue.

Nous n'avons eu aucun succès avec la méthode d'inhibition en procédé indirect à deux temps (sérum positif normal, puis sérum positif conjugué) tout comme avec le procédé à un temps (application sur la lame du mélange à parties égales des deux sérums, le positif normal à une concentration 5 ou 10 fois supérieure à celle du positif conjugué) ; cela n'étonnera pas les adeptes de l'immunofluorescence et nous fait croire que la mesure des anticorps anti-mycoides par ce moyen doit fournir des résultats assez aléatoires.

B. — L'identification de *M. mycoïdes* et le diagnostic de la péripneumonie.

1) La méthode d'immunofluorescence met fort bien en évidence *M. mycoïdes* de façon indirecte et de façon directe, qu'on emploie des immuns sérums artificiels préparés sur animaux de laboratoire ou des sérums positifs prélevés sur des bovins naturellement infectés.

Toutefois nous avons obtenu une meilleure brillance avec les immuns sérums artificiels préparés sur mouton ; nous pensons qu'il ne

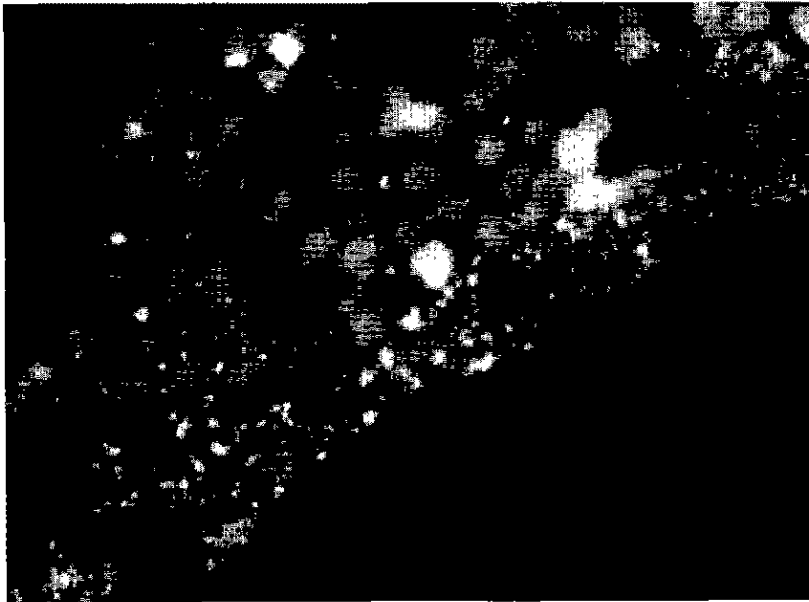


Photo n° 6. — Même coupe ; lumière d'un vaisseau lymphatique que commencent à envahir les cellules inflammatoires. Le film de lymphe est ici rétracté et les grosses tâches lumineuses sont vraisemblablement des amas de mycoplasmes à l'intérieur de phagocytes.

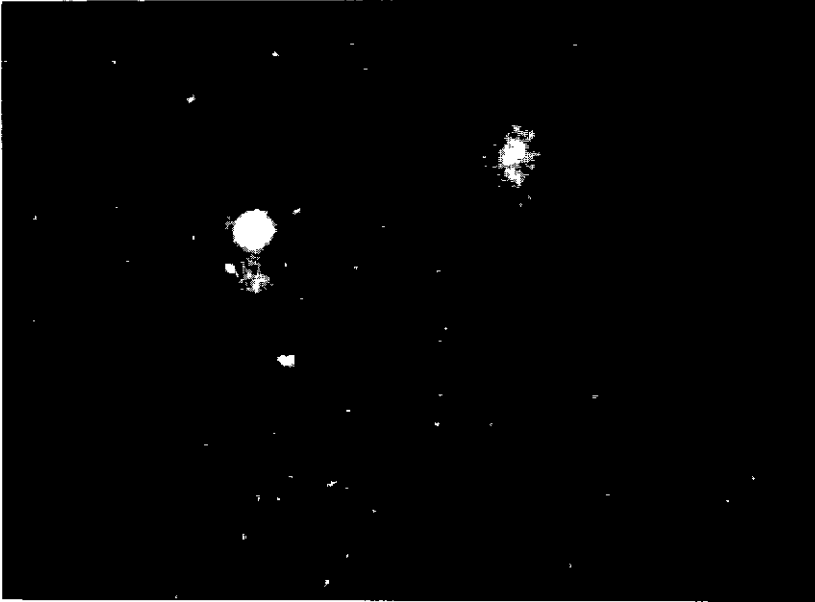


Photo n° 7. — Même coupe : autre vaisseau lymphatique où les cellules inflammatoires sont au contact des mycoplasmes. Image de phagocytose.

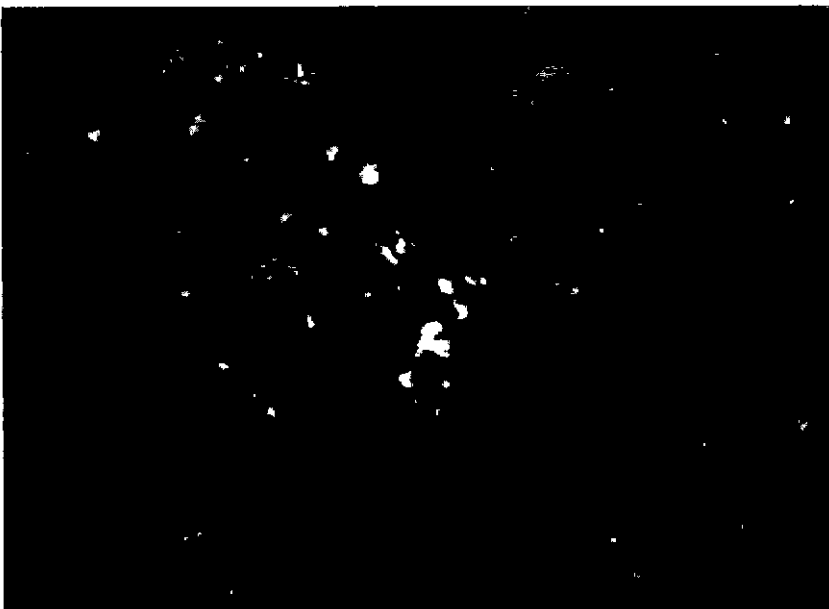


Photo n° 8. — Coupe de lésion pulmonaire, traitée par la méthode directe ; cette lésion est aiguë, comme le montrent la congestion et l'œdème des parois alvéolaires (les hématies sont en noir). Les mycoplasmes apparaissent très nettement, isolés ou en petits amas, dans la cavité alvéolaire à demi comblée par l'exsudat et les cellules inflammatoires.

s'agit pas ici d'un phénomène fortuit, car ces sérums ont des titres d'anticorps très élevés et sont fortement précipitants, en particulier à l'égard du « galactane ». Il est donc vraisemblable qu'il y ait une forte fixation de molécules d'anticorps conjugué à la surface des germes.

2) Cette immunofluorescence apparaît spécifique ; toutefois quelques réserves sont à faire :

a) il est nécessaire, pour plus de sûreté dans les examens, d'utiliser l'antisérum en méthode indirecte ou le conjugué en méthode directe à une dilution telle que les anticorps communs soient pratiquement éliminés (1/25, 1/50 et 1/100 dans nos essais).

b) un conjugué anti-*M. mycoides* fait briller non seulement les souches de *M. mycoides* isolées de cas de péripneumonie authentique, mais aussi les mycoplasmes des chèvres sérologiquement apparentés (et de façon étroite) à *M. mycoides*. Les souches précédemment citées (VOM, C11) brillent de façon égale (+ + +) aux souches de *M. mycoides* (cf. tableau 1) et c'est là une confirmation supplémentaire de leur identité sérologique, maintes fois constatée dans notre laboratoire par diverses méthodes (agglutination en tube, hémagglutination passive, fixation du complément, inhibition de croissance). Rappelons que la souche VOM est originaire de Nigeria et qu'elle nous a été transmise par les soins du laboratoire de FARCHA ; on croit, sans en être certain, qu'elle est la souche originelle de LONGLEY (5) ; s'il en est bien ainsi, elle n'est nullement représentative des souches de *M. mycoides* var. *capri*, responsables de la pleuro-pneumonie contagieuse des chèvres (PG3, OSB42, FARCHA) examinées ici et séparées nettement de *M. mycoides* par l'immunofluorescence.

La souche C11 qui lui est identique a été isolée en 1962 du poumon d'une chèvre atteinte de la pneumonie contagieuse fréquemment observée au Tchad en saison froide ou pendant les pluies ; sur un troupeau de 150 animaux, 50 environ étaient atteints. Il est bien difficile de dire si les mycoplasmes isolés étaient les seuls responsables de cette enzootie, car *P. multocida* A et *P. hemolytica* leur étaient associées chez plusieurs animaux ; l'infection à *Miyagawanella* fréquente dans les mêmes conditions (10) n'avait pu être mise en évidence.

Un conjugué anti-souche VOM peut être utilisé comme un conjugué anti-*M. mycoides* car il fournit les mêmes résultats avec les autres groupes de mycoplasmes (cf. tableau I). En bref, ces souches isolées chez les chèvres doivent être considérées comme appartenant effectivement à l'espèce *mycoides* var. *mycoides*, puisqu'aucun caractère différentiel probant ne peut être relevé.

c) il faut dire aussi que le conjugué anti-var. *mycoides*, peut marquer les souches var. *capri* Pg3, OSB42 et Farcha, mais avec une brillance nettement plus faible que pour l'antigène homologue (\pm contre + + +). Le test n'est donc pas absolument négatif et il n'y a là rien d'étonnant étant donné les communautés antigéniques partielles ; en tout état de cause, la distinction est faite nettement par le technicien averti.

3) Les autres mycoplasmes rencontrés chez les ruminants (*M. agalactiae*, *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *M. laidlawii*) ne fournissent que des réactions négatives avec un conjugué anti-*mycoides* (cf. tableau I).

De façon identique un conjugué anti-*bovirhinis* (c'est l'espèce qui a, lors d'un isolement à partir de lésions pulmonaires douteuses, les plus grandes chances d'être confondue au départ avec un *M. mycoides*) donne une réaction négative avec les antigènes de ce dernier.

4) La recherche de *M. mycoides* dans les coupes histologiques nous semble intéressante. A condition de disposer de fragments de poumon au stade de l'hépatisation rouge et comportant des septa interlobulaires œdémateux, cette lecture est relativement facile et sa valeur est garantie par le résultat négatif que fournit la même coupe traitée par le conjugué absorbé.

Cet examen peut être rétrospectif, car certains de nos prélèvements étaient inclus en paraffine depuis 5 ans.

Les coupes de poumons de veaux atteints de « pasteurellose » offrent une image histologique qui n'est pas sans rapport avec l'image de la péripneumonie ; on y retrouve souvent la même dilatation des travées interlobulaires et la même thrombose des lymphatiques mais les mycoplasmes qu'occasionnellement on pourrait y trouver ne brillent pas avec un conjugué anti-*mycoides*.

TABLEAU N° I

Résultats globaux des examens en immunofluorescence

Immunoserums conjugués utilisés en méthode directe	<i>M. mycoides</i> var. <i>mycoides</i>		<i>M. mycoides</i> var. <i>capri</i>	<i>M. bovirhinis</i> *	<i>M. bovigentialium</i>	<i>M. laidlawii</i>
	Péricapnemonie bovine	Pneumonie des chèvres	Pleurapneumonie contagieuse de la chèvre	Syndrôme grippal des veaux	Tractus génital des bovins	Saprophytes
	Souches : Afade et Fatick	C 11 et Vom	OSB 42, PG 3 et Farcha	Nantes 1,4 et 6 MV5, MV8, MVX Somme 611, 777 et 782, PG 43	106/12 et PG 11	L 8 et S 35
1/ Anti- <i>mycoides</i> expérimental au 1/100	+++	+++	+	-	-	-
2/ Anti- <i>mycoides</i> de malades naturels au 1/25	+++	+++	+	-	-	-
3/ Anti- <i>mycoides</i> Vom expérimental au 1/50	+++	+++	+	-	-	-
4/ Anti- <i>bovirhinis</i> expérimental au 1/50	-	-	-	(Somme 611 +++ (Nantes 6 (MV 5, MVX + pour les autres	- 106/12 + PG 11	-

* Le comportement sérologique de l'ensemble des souches groupées sous la dénomination *bovirhinis* n'est pas homogène vis-à-vis du sérum anti-*bovirhinis* MV₅, bien que toutes ces souches aient été isolées soit des naseaux soit des poumons de bovins atteints de syndrome grippal ; il s'agit certainement de types sérologiques différents.

N.B. Les quatre antisérums utilisés sont négatifs vis-à-vis de *M. agalactiae* (souche PG₂) et *M. gallisepticum* (souches S₆ et PG₃₁).

Pour un diagnostic rapide, il serait plus logique d'utiliser de simples décalques de section de poumon, mais les risques d'avoir sur les lames des débris cellulaires fort gênants sont tels que nous avons écarté à priori ce procédé.

C. — L'immunofluorescence et le diagnostic d'espèce des mycoplasmes.

Les essais décrits ici sont des travaux préliminaires qui n'ont mis en œuvre que des sérums anti-*M. mycoides* (souches bovines et caprines) et anti-*M. bovirhinis* ; cependant il est encourageant de constater que l'immunofluorescence nous permettra sans doute d'identifier les espèces de mycoplasmes beaucoup plus vite qu'avec les moyens sérologiques habituels (notamment l'inhibition de croissance considérée comme le meilleur test actuel).

D'ailleurs les résultats attendus ne dépendent pas tellement de la technique d'immunofluorescence en elle-même, mais bien plus de la préparation préalable d'antisérums spécifiques d'espèce ou de type sérologique. Si pendant longtemps ces sérums ont été réputés difficiles à obtenir, c'est parce que les réactions croisées dues aux antigènes de groupe ont un peu effrayé les sérologistes. En fait, elles ne semblent pas si importantes et le problème le plus ennuyeux qui se pose au microbiologiste lors de l'isolement et de l'identification d'une souche de mycoplasme, c'est bien l'obtention d'une masse de mycoplasmes

suffisante pour préparer l'antisérum et l'antigène que mettront en jeu les procédés sérologiques actuels d'identification.

Or l'immunofluorescence pourrait permettre l'identification du mycoplasme à partir de la *primoculture*, qu'elle soit faite en milieu liquide ou sur milieu solide.

CONCLUSIONS

Les mycoplasmes peuvent être identifiés par la méthode d'immunofluorescence.

Ce procédé apporte un moyen supplémentaire au diagnostic de la péripneumonie puisque *M. mycoides* peut être identifié dans les cultures (en milieux solide et liquide) dans les exsudats pathologiques et dans les coupes histologiques de lésions pulmonaires.

À la lumière de notre expérience, nous pouvons même affirmer que, pour un technicien averti disposant de préparations correctes, ce diagnostic par immunofluorescence est facile.

La spécificité de cette méthode est bonne puisque les sérums conjugués antimycoides sont négatifs avec *M. mycoides* var. *capri*, *M. bovirhinis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* et *M. laidlawii*.

Les résultats de ces essais conduisent à penser que l'identification des diverses espèces de mycoplasmes pourrait se faire par le test d'immunofluorescence plus aisément que par les moyens sérologiques actuels.

SUMMARY

The fluorescent antibody method for identifying mycoplasmas. Application for the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia

The application of the fluorescent antibody method for identifying mycoplasmas, and specially for detecting *M. mycoides* in cultures as in pathological exudates and lesions, is carried out by classical procedures by using artificial immune anti-*mycoides* sera or bovine sera from natural cases. Results showed that this method is quite specific and that cross-reactions are not to be feared with other species of mycoplasma from ruminants, if minimal care is taken.

Technical conditions of this investigation are described in detail.

RESUMEN

El método de inmunofluorescencia y la identificación de los micoplasmas. Aplicación al diagnóstico de la perineumonía

La aplicación del método de inmunofluorescencia a la identificación de los micoplasmas y particularmente a la búsqueda de *M. mycoides*, en los cultivos

así como en los exudados patológicos y las lesiones, se efectúa mediante los procesos clásicos utilizando ya sueros experimentales anti-mycoides, ya sueros de bovinos enfermos naturales. Los resultados muestran que el dicho proceso es específico y que reacciones cruzadas no son de temer con otras especies de micoplasmas encontrados en los rumiantes, si se precautela suficientemente. Se describen en detalle las condiciones técnicas de estos exámenes.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARILE (M. F.), MALIZIA (W. F.) et RIGGS (D. B.). — Incidence and detection of pleuropneumonia-like organisms in cell cultures by fluorescent antibody and cultural procedures. *J. Bact.*, 1962, **84** : 130-136.
2. CLARK (H. W.), BAILEY (J. S.), FOWLER (R. C.) et BROWN (T. McP.). — Identification of Mycoplasmataceae by the fluorescent antibody method. *J. Bact.*, 1963, **85** : 111-118.
3. KARBE (E.) et HELMBOLDT (C. F.). — Diagnose der Mykoplasmen-mastitis beim rind mit hilfe von fluoreszierenden antikörpern. *Zentralblatt für veterinarmedizin*, 1968, **15** (3) : 372-381.
4. LIU (C.). — Studies on primary atypical pneumonia. I. Localization, isolation and cultivation of a virus in chick embryos. *J. Exptl. Med.*, 1957, **106** : 455.
5. LONGLEY (E. O.). — Contagious caprine pleuro-pneumonia. A study of the disease in Nigeria. Colon. Res. Publ. N° 7, H. M. Stationery office London, 1951.
6. MALIZIA (W. F.), BARILE (M. F.) et RIGGS (D. B.). — Immunofluorescence of pleuropneumonia-like organisms isolated from tissue cell cultures. *Nature*, 1961, **191** (4784) : 190-191.
7. MASIGA (W. N.) et STONE (S. S.). — Application of a fluorescent antibody technique for the detection of *Mycoplasma mycoides* antigen and antibody. *J. Bact.*, 1968, **96** (5) : 1867-1869.
8. MASIGA (W. N.) et STONE (S. S.). — Fluorescent antibody and agar gel diffusion techniques to detect *Mycoplasma mycoides* in fresh and formalin-fixed lung lesions of cattle. *Bull. epizoot. Dis. Afr.*, 1968, **16** (4) : 399-404.
9. NOEL (J. K.), DE VOLT (H. M.) et FABER (J. E.). — Identification of *Mycoplasma gallisepticum* in lesion tissue by immunofluorescence. *Poultry Science*, 1964, **43** (1) : 145-149.
10. PROVOST (A.). — Identification au Tchad d'un virus du groupe des Chlamydozoacées, pathogène pour la chèvre. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1957, **10** (2) : 2.
11. ROBINSON (F. R.), MOORE (R. W.) et REDMOND (H. E.). — Immunofluorescence studies of *Mycoplasma hyoarthrinosa* infection in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1967, **28** (122) : 141-147.